

Figure 4 Preparation of hCL5-expressing BV.

WT-BV and hCL5-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HT1080/hCL5 cells was used as a positive control.

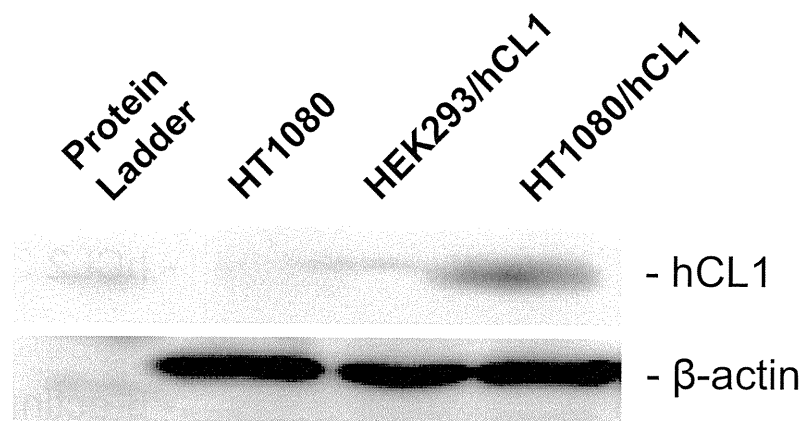


Figure 5 hCL1 expression in HT1080/hCL1 cells.

Lysates of HT1080, hCL1-expressing HEK293 (HEK293/hCL1) and hCL1-expressing HT1080 cells (HT1080/hCL1) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysates of HT1080 and HEK293/hCL1 were used as a negative and positive control.

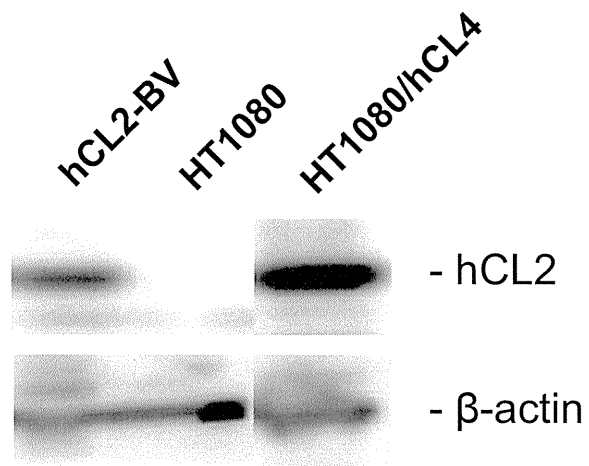


Figure 6 hCL2 expression in HT1080/hCL2 cells.

Lysates of hCL2-expressing Budded Baculovirus (hCL2-BV), HT1080 and hCL2-expressing HT1080 cells (HT1080/hCL2) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HT1080 and hCL2-BV were used as a negative and positive control.

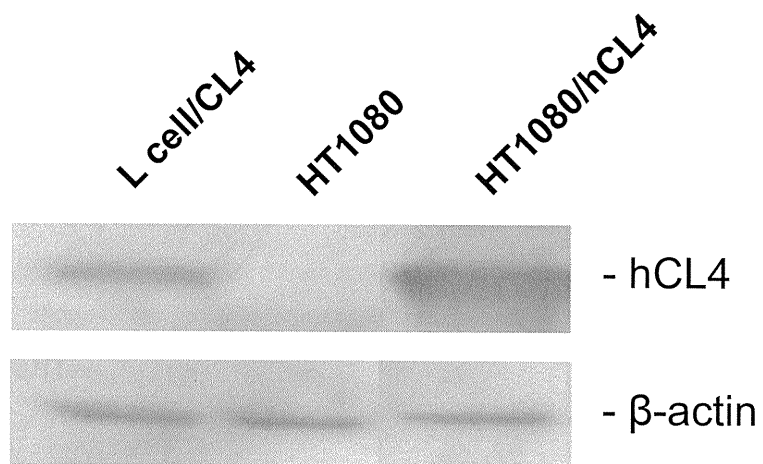


Figure 7 hCL4 expression in HT1080/hCL4 cells.

Lysates of CL4-expressing L cell (L cell/CL4), HT1080 and hCL4-expressing HT1080 cells (HT1080/hCL4) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysates of HT1080 and L cell/CL4 were used as a negative and positive control.

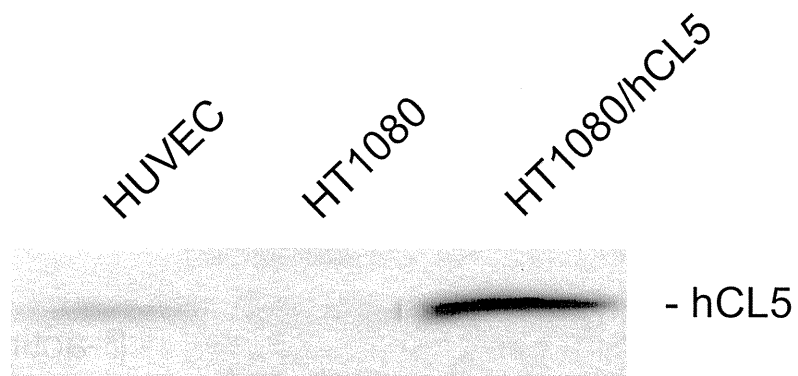
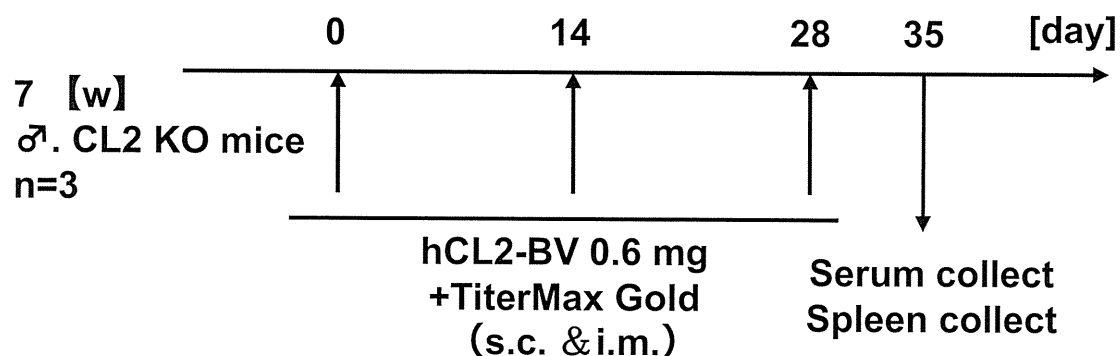


Figure 8 hCL5 expression in HT1080/hCL5 cells.

Lysates of HT1080 and HT1080/hCL5 (10 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HUVEC cells was used as a positive control.

A



B

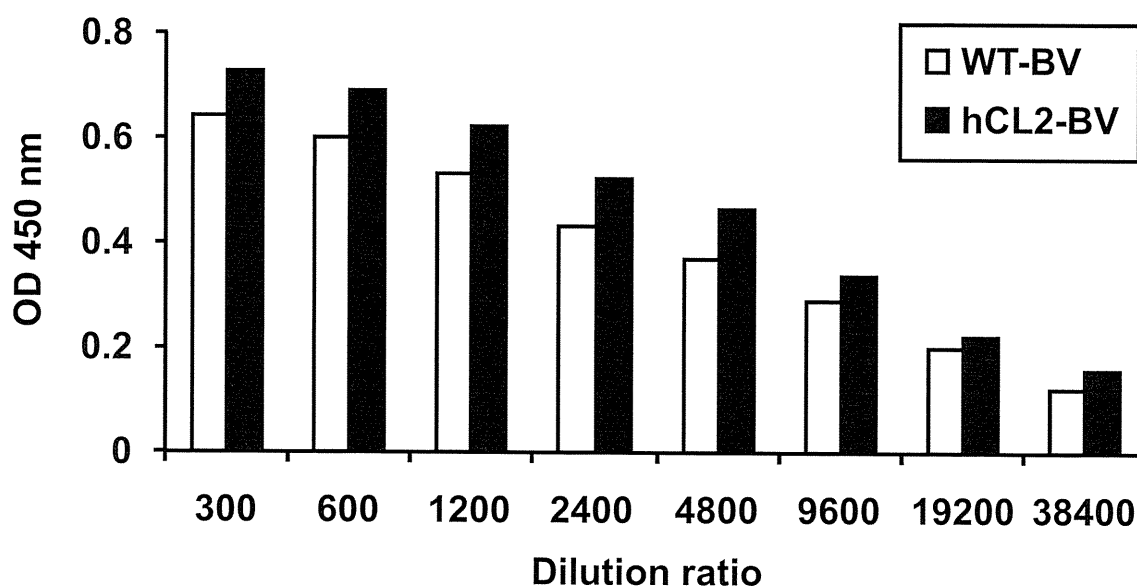


Figure 9 Immunization of hCL2-BV.

(A) The schedule of immunization and sample collection. Mice were immunized subcutaneously and intramuscularly with 0.6 mg of hCL2-BV in PBS and TiterMax Gold once two weeks for a 4 week period. Seven days after immunization, serum and spleen were collected. (B) Detection of specific anti-CL2 antibodies. Immunoplate was coated with 0.5 μ g WT-BV or hCL2-BV and diluted serum were added to the immunoplate. Antibodies in serum bound to the BV-coated plate were detected by ELISA with anti-mouse IgG antibody.

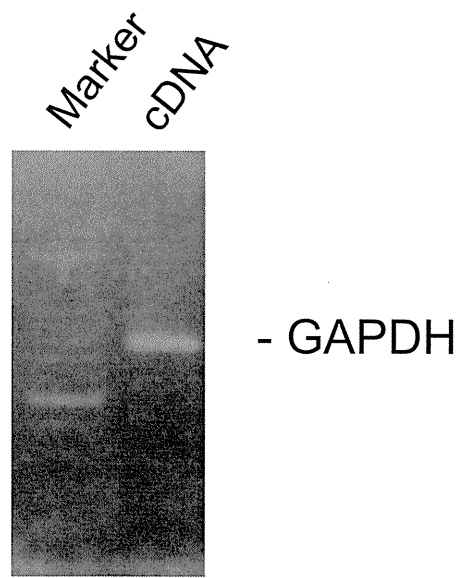


Figure 10 Preparation of cDNA for construction of scFv phage display library.

cDNA was made from mRNA purified from spleen in mice immunized with hCL2-BV. By using the cDNA, GAPDH expression was analysed by RT-PCR. The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, followed by staining with ethidium bromide.

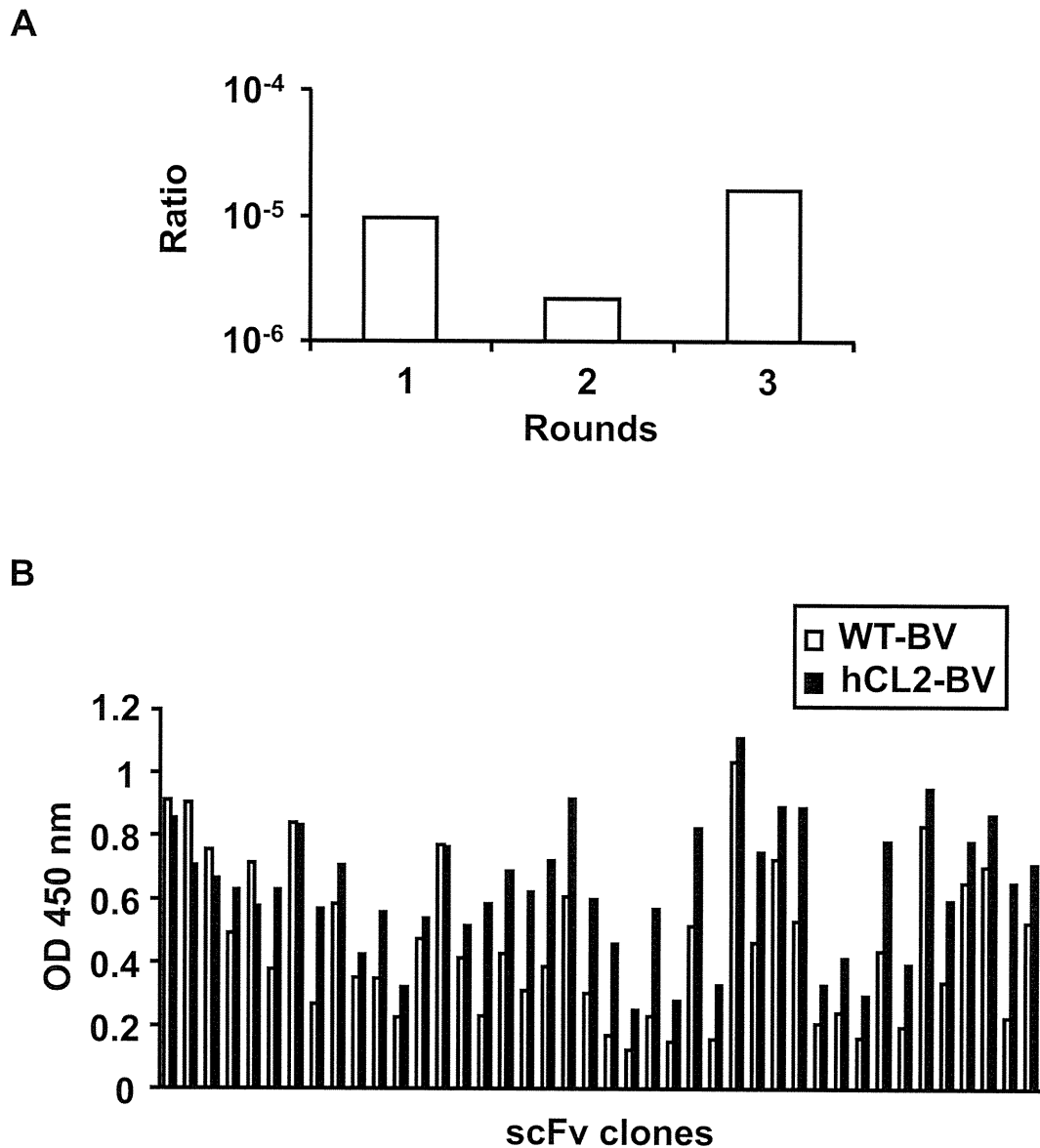


Figure 11 Screening of a hCL2 binder.

A) Enrichment of phages with affinity to hCL2-BV. Immunoplate coated with hCL2-BV were incubated with the scFv phage library at 2.1×10^6 CFU titer (1st input phage). The phages bound to hCL2-BV were recovered (1st output phage). The hCL2 -BV-binding phages were subjected to two additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated.

B) Monoclonal analysis of scFv phage. Phage clones after 3rd round panning with hCL2 -BV were adopted to the WT- or hCL2-BV-coated immunoplates. Phage clones bound to the CL-BV-coated immunoplates were detected by ELISA with an anti-M13 mAb.

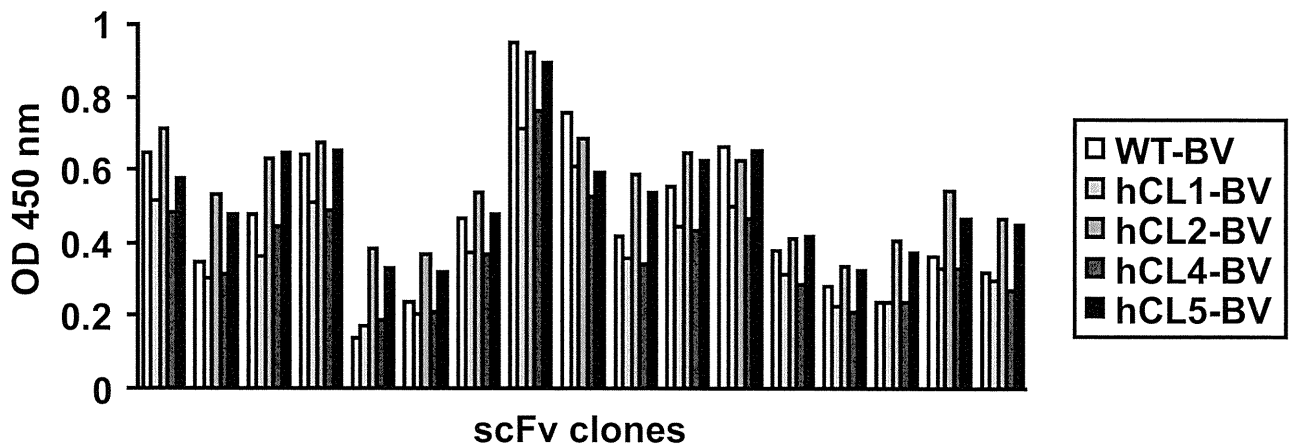


Figure 12 CL-binding characterization of the isolated hCL2 binders. Monoclonal analysis of scFv phage. Phage clones after 3rd round panning with hCL2 -BV were adopted to the WT-, hCL1-, hCL2-, hCL4-, hCL5-BV-coated immunoplates. Phage clones bound to the CL-BV-coated immunoplates were detected by ELISA with an anti-M13 mAb.

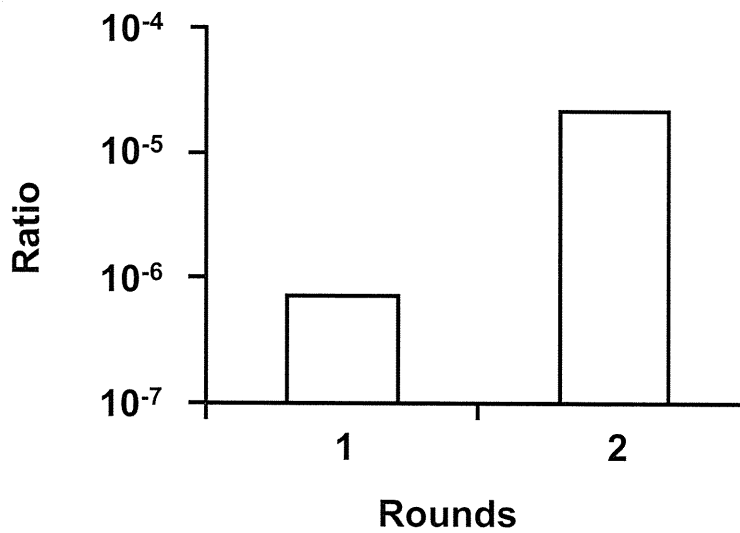


Figure 13 Panning of a hCL2 binder.

Enrichment of phages with affinity to hCL2-BV. Immunoplate coated with hCL2-BV were incubated with the scFv phage library at 8.1×10^{11} CFU titer (1st input phage). The phages bound to hCL2-BV were recovered (1st output phage). The hCL2-BV-binding phages were subjected to another additional cycle of the incubation and wash step, resulting in 2nd output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated.

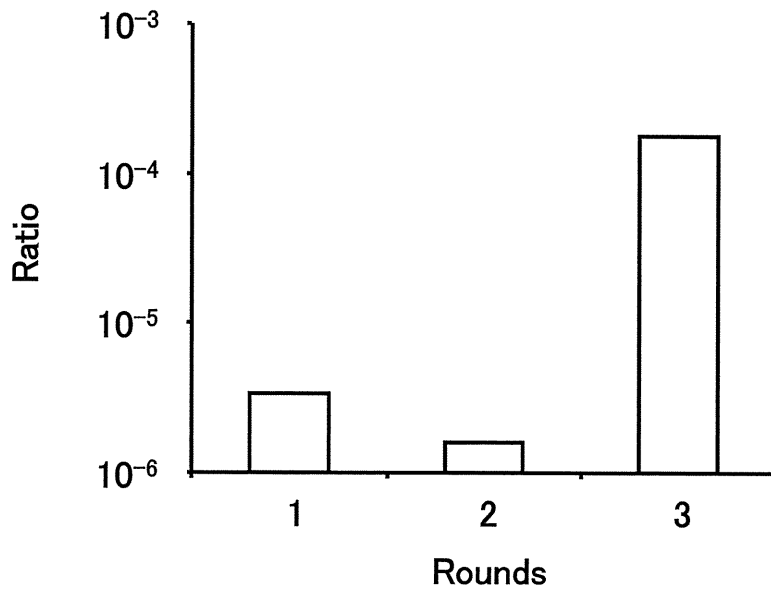


Figure 14 Panning of a hCL1 binder.

Enrichment of phages with affinity to hCL1-BV. Immunoplate coated with hCL1-BV were incubated with the scFv phage library at 8.1×10^{11} CFU titer (1st input phage). The phages bound to hCL1 -BV were recovered (1st output phage). The hCL1-BV-binding phages were subjected to another additional cycle of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated.

scFv 提示ファージライブラリの構築

分担研究者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

現在までに C 型肝炎ウイルスの感染受容体として、claudin(CL)-1、occludin、CD81、Scavenger receptor class B type I(SR-BI)などが同定され、感染受容体アンタゴニストを利用した C 型肝炎ウイルス感染阻害法の可能性が提唱された。2010 年に抗 CL-1 抗体が多様な genotype の C 型肝炎ウイルスに対し感染阻害活性をもつことが示されたことから、CL-1 アンタゴニストが C 型肝炎ウイルス感染阻害薬の候補として注目されている。しかしながら、CL-1 アンタゴニストの創製に成功した例は唯一この報告のみであり、druggable CL-1 binder の開発は未だ皆無である。

一本鎖抗体(scFv)は、抗体の可変領域(VH, VL)のみから構成され、IgG に比べ分子量が約 1/5 と低分子であることから、血管から組織への移行性に優れており、大腸菌により組換え蛋白質として産生可能であることから、製造コストが低く抑えられるなど、創薬上のメリットがある。このように、scFv を利用とした CL-1 アンタゴニストは druggable CL-1 binder としての可能性があるものの、膜蛋白質である CL は精製が困難であり、抗原性も低いいためその創製は立ち遅れているのが現状である。

そこで本研究は、CL-1 結合性 scFv を取得するため、CL 遺伝子欠損マウスと出芽バキュロウイルスを利用した CL 蛋白質発現技術とを融合した CL binder 創製システムを用いることにより、ファージディスプレイ scFv ライブラリを構築した。

A. 研究目的

現在までに、C 型肝炎ウイルス(HCV)の受容体として、CD81、claudin(CL)-1、occludin、Scavenger receptor class B type I(SR-BI)などが同定されている。HCV のエンベロープ蛋白質である E2 蛋白質が感染受容体に結合すると、HCV 粒子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることから、感染受容体の細胞外領域に結合して HCV との結合を阻害する分子を創製することができれば、感染阻害作用を有する C 型肝炎治療薬の開発に繋がると考えられる。実際、2010 年に抗 CL-1 抗体が多様な genotype の C 型肝炎ウイルスに対し、感染阻害活性をもつことが示され、CL-1 アンタゴニストが C 型肝炎ウイルス感染阻害薬として有望であることが示された。しかしながら、CL-1 アンタゴニストの創製に成功した例

は唯一この報告のみであり、druggable CL-1 binder の開発は立ち遅れているのが現状である。

そこで本研究は、肝細胞における C 型肝炎ウイルス感染受容体をターゲットとした C 型肝炎治療および予防薬を独自の CL binder 作製技術を利用することにより創製しようとするものであり、我が国の個組の健康増進といった社会的側面のみならず、バイオメーカーの育成や我が国の知的財産の確保にも大きく貢献できるものである。

本年度は、CL 提示バキュロウイルスを免疫することにより得た CL 抗体産生マウスを利用し、scFv ライブラリの構築を試みた。

B. 研究方法

scFv ライブラリの作製

B.1 scFv ファージライブラリの構築

hCL2-BV を免疫した CL2 遺伝子欠損マウスから脾臓を摘出し、total RNA を回収した。Total RNA から mRNA を精製し、cDNA を合成した。cDNA 4 μ l を鋳型として forward primer set 2 μ l、reverse primer set 2 μ l、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、DMSO 1 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニーリング温度 50°C で 30 sec、伸長反応 68°C で 1 min に設定した 35 サイクルの PCR 反応に供し、それぞれ VH 鎖、VL 鎖の cDNA を得た。この PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN) で精製し、続く PCR による VH、VL の連結、増幅 (assembly PCR) に供した。VH 鎖 cDNA を 100 ng、VL 鎖 cDNA を 100 ng、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、DMSO 1 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニーリング温度 65°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 18 サイクルの条件に設定し assembly PCR を行った。さらに scFv 100 ng、Not I サイトを有する Y15 primer (5'-ggccagctttggagcctttttttggagattttcaacgtgaaaaaattttatttcgcaattccttttagttgttctcttctatgcggccagccggccatggcc-3') 0.4 μ l、Nco I サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaatgaattttotgtatgaggttttgctaacaactttcaacagtctatgcggcacgcggttccaccggatccggatacggcaccggcgccacctgcgccgc-3') 0.4 μ l、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、DMSO 1 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニーリング温度 65°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 35 サイクルの条件に設定し PCR を行い、scFv を増幅した。PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製し、scFv 遺伝子とした。scFv 遺伝子を Nco I、Not I で 37°C、20 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に Nco I、Not I で 2 h 処理し、切り出し精製した pY03'-importin α を 1 μ g、scFv 遺伝子を 0.8 μ g 用いて T4 DNA ligase を用いて 16°C にて一晚ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物を PCR Purification Kit で精製した。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 (STRATAGENE) にエレクトロポレーションすることにより形質導入した。その後、100 μ g/ml ampicillin sodium と終濃度 2% D-glucose を添加した LB 培地 (LAG 培地) プレートに播種した。

一晚培養後の大腸菌のコロニーをセルスクレーパーにより LAG 培地で回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10% となるようにグリセロール (ナカライテスク) を添加して -80°C で保存し、scFv ライブラリとした。

B.2 エレクトロポレーション

TG1 をグリセロールストックから 2YT (2-YT BROTH, Invitrogen) 培地 2 ml で一晚培養した。翌日、2YT 培地 200 ml に OD600 = 0.05-0.1 となるように植え継ぎ、37°C で OD600 = 0.4-0.6 まで培養した。その後、4°C、3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨て、milliQ を加え懸濁し、さらに 4°C、3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨てた。この洗浄作業を三回繰り返した後、TG1 を終濃度 10% のグリセロールを含む SP 水で懸濁した。TG1 溶液 50 μ l とライゲーション産物 1 μ l (30 セット) を氷上で 15 分間なじませた後、混合液をキュベットに移し、Gene pulser[®] (Bio-Rad Laboratories) を用いて電気パルスを与えた (Ec1)。その後、終濃度 2% D-glucose を添加した 2YT (2YTG) 培地 950 μ l に移し、37°C で 1 時間振盪培養した。Titer check 用として、この大腸菌溶液のうち 50 μ l を 100 μ g/ml ampicillin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10²-10⁶ 倍希釈し、ペトリフィルム (3M Microbiology Products) に播き、37°C で一晚培養後、コロニー数を計測することでライブラリのサイズを求めた。また、残り的大腸菌溶液をプレート 1 枚あたり約 300 μ l となるように LAG 培地プレート 40 枚に播種した。翌日、プレート 1 枚あたり 2 ml の LAG 培地でセルスクレーパーを用いて大腸菌を回収し、終濃度 10% となるようにグリセロールを添加し -80°C で保存した。

B.3 scFv ファージライブラリの多様性確認

エレクトロポレーションの際に播種したペトリフィルムからコロニーをランダムにピックアップし、LA 培地 3 ml で一晚培養した。その後、ミニプレップにより plasmid を精製した。精製した plasmid を鋳型として、primer として pY03'-S-1 (5'-caggaaacagctatgac-3') を用い、シーケンス解析を行った。

C. 研究結果

hCL2-BVを抗原として免疫したCL-2遺伝子欠損マウスから脾臓を摘出し、total RNAを抽出後、mRNAを精製し、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型にして重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）をPCRにより増幅した。VH、VL鎖をリンカーで連結して得たscFv断片をNco I/ Not I処理しpY03'に組み込んだ。得られたcDNAライブラリをエレクトロポレーション法により大腸菌TG-1に導入したものをライブラリとした。構築したライブラリのサイズは 8.2×10^5 CFUであった。

D. 考察

免疫ライブラリは 10^5 - 10^6 CFU程度のライブラリサイズを有し、非免疫ライブラリと比して多様性の面では劣るが、抗原への指向性の面では優れている。今回構築したhCL2免疫scFvライブラリのライブラリサイズは 8.2×10^5 CFUであった。ランダムに選出した5つのクローンの内、2つはFLAG付きscFvを提示していたことから、このファージライブラリは40%の割合でscFv遺伝子をコードしていることが分かった。また、抗体遺伝子の配列の多様性は抗原との結合に重要なVH鎖のCDR3領域において見られることから、この領域に着目したところクローン間でのアミノ酸配列に多様性がみられた(Table 1)。そのため本ライブラリはhCL-1 binder取得に際し有用なスクリーニングソースであると考え、hCL-1 binderスクリーニング実験に供した。

E. 結論

本研究は、CL提示バキュロウイルスを免疫することにより得たCL抗体産生マウスを利用し、CL-1結合性scFv取得に十分なscFvライブラリを構築した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshikawa M., Mukai Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S. : Modifying the antigen-immunization schedule improves the variety of monoclonal antibodies obtained from immune-phage antibody libraries against HIV-1 Nef and Vif., *J. Biosci. Bioeng.*, 111(5):597-599, 2011.
2. Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials.*, 32(23):5498-504, 2011.
3. Narimatsu S., Yoshioka Y., Watanabe H., Masano T., Morishige T., Yao X., Tanabe A., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Lysine-deficient lymphotoxin- α mutant for site-specific PEGylation., *Cytokine.*, 56(2): 489-493, 2011.
4. Narimatsu S., Yoshioka Y., Morishige T., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Nishimura MI., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Structure-activity relationship of T-cell receptors based on alanine scanning., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415(4): 558-562, 2011.
5. Yamashita T., Okamura T., Nagano K., Imai S., Abe Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer., *Pharmazie*, 67: 253-255, 2011.
6. Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel DDS for site-specific PEGylated proteins., *Chem. Cent. J.*, 5(25):1-6, 2011.

2. 学会発表

1. 角田慎一:抗体プロテオミクス技術による創薬ターゲットタンパク質の効率的探索,生物化学的測定研究会第16回学術集会,大阪,2011年6月.
2. 角田慎一:TNF構造変異体の創製と機能解析、疾患治療への応用,回折構造生物第169委員会第35回研究会,東京,2011年6月.
3. 角田慎一:機能性TNF- α 変異体の創製と難治性疾患治療への応用,CPhI Japan 2011,大阪,2011年7月.
4. 角田慎一、機能性TNF- α 変異体の創製と難治性疾患治療への応用、第7回理研ものづくりシンポジウム,埼玉,2012年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	(G4S) ³
Clone 1								
Clone 2	DIVMKQSHKFM STSVGDRVSITC	KASQD MGSKVA	WYQQRPGQ SPKLLIY	WTSTRHV	GVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLADYFC	QQYS SYPLT	FGAGTK LELER	GGGGSGGG GSGGGGS
Clone 3	DIELTQSQKFMS TSVGDRVSITC	KASQD VSTAVA	WYQQKPGQ SPKLLIY	SASYRYT	GVPDRFTGSGSGTDFT FTISSVQAEDLAVYYC	QQHY STPYT	FGGGTK LELKR	GGGGSGGG GSGGGGS
Clone 4	DIVMTQTPASLV VSLGQRATISC	RASQSVSS SSYSYMH	WYQQKPGQ PPKLLIK	YASNLES	GVPARFSGSGSGTDFTL NIHPVKEEDTATYYC	QHSW EIPYT	FGGGTK LELKR	GGGGSGGG GSGGGGS
Clone 5	DIVMTQSHKFM TSVGDRVSITC	KASQDV STAVA	WYQQKPGQ SPKLLIY	SASYRYT	GVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFC	QQYS SYMPT	FGGGTK LEIKR	GGGGSGGG GSGGGGS
VH								FLAG
Clone 1								
Clone 2	EVQGVESGGGLVKPG GSLKLSAASGFTFS	DYGMH	WVRQAPEKGLE WVA	YISSGSSTIY YADTVKG	RFTISRDNAKNTLFLQM TSLRSEDAMYYCAR	QLRY	WGQGT LTVSS	◦
Clone 3	EVMLVESGGGLVQPG GSLKLSAASGFTFS	SYAMS	WVRQTPEKR LDWVA	TISDGGSYTY YPDNVKG	RFTISRDNAKNNLYLQM SHLKSEDAMYYCAR	DPWDVG YWYFDV	WGTGTT VTVSS	◦
Clone 4								
Clone 5	EVQLEESGGGLVKPG GSLKLSAASGFTFS	DYGM	WVRQAPEKGLE WVA	YISSGSSTIY YADTVKG	RFTISRDNAKNTLFLQM TSLRSEDAMYYCAR	IGYYGSSY NWWYFDV	WGTGTP LTVFL	*

Table 1 Amino acid sequence of scFv phage library.

Phage clones were randomly picked up from the scFv phage library, and the amino acids sequences of scFv clones were analyzed.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当事項なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li X, Kondoh M, Watari A, Hasezaki T, Isoda K, Tsutsumi Y, Yagi K.	Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice.	<i>Pharmazie</i> ,	66 (4)	282-6	2011
Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Watari A, Yagi K.	Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies.	<i>Drug Discov Today</i>			In press
Yoshikawa M., Mukai Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S.	Modifying the antigen-immunization schedule improves the variety of monoclonal antibodies obtained from immunophage antibody libraries against HIV-1 Nef and Vif.	J. Biosci. Bioeng	111(5)	597-599	2011
Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.	Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning.	Biomaterials	32(23)	5498-504	2011
Narimatsu S., Yoshioka Y., Watanabe H., Masano T., Morishige T., Yao X., Tanabe A., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.	Lysine-deficient lymphotoxin- α mutant for site-specific PEGylation.	Cytokine.	56(2)	489-493	2011

Narimatsu S., Yoshioka Y., Morishige T., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Nishimura MI., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.	Structure-activity relationship of T-cell receptors based on alanine scanning.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	415(4)	558-562	2011
Yamashita T., Okamura T., Nagano K., Imai S., Abe Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.	Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer.	Pharmazie	67	253-255	2011
Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Development of a novel DDS for site-specific PEGylated proteins.	Chem. Cent. J.	5(25)	1-6	2011

Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice

X. LI¹, M. KONDOH¹, A. WATARI¹, T. HASEZAKI¹, K. ISODA¹, Y. TSUTSUMI², K. YAGI¹

Received September 13, 2010, accepted October 15, 2010

Masuo Kondoh, Ph. D., Laboratory of Bio-Functional Molecular Chemistry
masuo@phs.osaka-u.ac.jp

Kiyohito Yagi, Ph. D., Laboratory of Bio-Functional Molecular Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan
yagi@phs.osaka-u.ac.jp

Pharmazie 66: 282–286 (2011)

doi: 10.1691/ph.2011.0778

Exposure to nano-sized particles is increasing because they are used in a wide variety of industrial products, cosmetics, and pharmaceuticals. Some animal studies indicate that such nanomaterials may have some toxicity, but their synergistic actions on the adverse effects of drugs are not well understood. In this study, we investigated whether 70-nm silica particles (nSP70), which are widely used in cosmetics and drug delivery, affect the toxicity of a drug for inflammatory bowel disease (5-aminosalicylic acid), an antibiotic drug (tetracycline), an antidepressant drug (trazodone), and an antipyretic drug (acetaminophen) in mice. Co-administration of nSP70 with trazodone did not increase a biochemical marker of liver injury. In contrast, co-administration increased the hepatotoxicity of the other drugs. Co-administration of nSP70 and tetracycline was lethal. These findings indicate that evaluation of synergistic adverse effects is important for the application of nano-sized materials.

1. Introduction

Nano-sized particles, which have a diameter of less than 100 nm, are widely used in medicine, food, and machinery. With their smaller size, the physical and chemical properties of their constituents change, so that they may be toxic, for example to the lungs or liver, even though macro-particles of the same materials are not (Byrne and Baugh 2008; Nishimori et al. 2009b). Some nano-sized particles show long-term accumulation or a wide distribution in the body (Byrne and Baugh 2008; Nishimori et al. 2009b; Xie et al. 2009; Yang et al. 2008).

Recent reports indicate that some nano-sized particles can generate reactive oxygen species (ROS) on their surfaces, leading to cellular injury (Jin et al., 2008; Sharma et al. 2007; Ye et al. 2010). There are also many drugs that cause adverse effects through the generation of ROS (Ali et al. 2002; Kovacic 2005; Xu et al. 2008). Thus, nano-sized particles might enhance the side-effects of some pharmaceutical drugs. Indeed, we have shown that 70-nm silica particles (nSP70) cause liver injury but that macro-sized silica particles with a diameter of 300 and 1000 nm do not (Nishimori et al. 2009b). Also, when co-administered to mice, nSP70 but not the macro-sized silica particles enhance the toxicity of cisplatin and paraquat (Nishimori et al. 2009a). Surprisingly, co-administration of cisplatin and nSP70 was lethal, suggesting that each chemical may have different synergistic effects in the presence of nano-sized materials. In the current study, to clarify the influence of nano-sized materials on the adverse effects of chemicals, we assessed the toxicity in mice of 5-aminosalicylic acid (an agent for treating inflammatory bowel disease), tetracycline (a broad-spectrum antibiotic), trazodone (an antidepressant), and acetaminophen (a common antipyretic analogue) in the presence or absence of nSP70.

2. Investigations and results

Several reports indicate that 5-aminosalicylic acid, which is used to treat inflammatory bowel disease, causes liver injury and interstitial nephritis (Deltenre et al. 1999; Margetts et al. 2001). Administration of 5-aminosalicylic acid caused an increase in ALT, AST and BUN levels (Fig. 1). Also, nSP70 dose-dependently elevated ALT and AST levels. Co-treatment with 5-aminosalicylic acid and nSP70 resulted in higher levels of ALT and AST than nSP70 alone. In contrast, changes in BUN levels in response to 5-aminosalicylic acid were not affected by nSP70.

Next, we investigated effect of nSP70 on tetracycline, a broad-spectrum antibiotic. As shown in Fig. 2A and 2B, administration of tetracycline did not elevate biochemical markers for liver injury. In contrast, co-administration with nSP70 resulted in the synergistic induction of liver injury. However, nSP70 alone did not cause kidney injury. Importantly, co-administration of 30 and 50 mg/kg nSP70 with tetracycline resulted in the death of 1 of 4 and 2 of 4 mice, respectively.

Finally, we investigated effect of nSP70 on toxicity of the antidepressant trazodone and the antipyretic analgesic acetaminophen. We found that nSP70 did not have a synergistic effect on the toxicity of trazodone (Fig. 3). In contrast, co-administration of acetaminophen with nSP70 caused synergistic liver injury (Fig. 4).

3. Discussion

In this study, we showed that nSP70 synergistically enhance the toxicity of 5-aminosalicylic acid, tetracycline, and acetaminophen but not trazodone. To avoid direct interac-

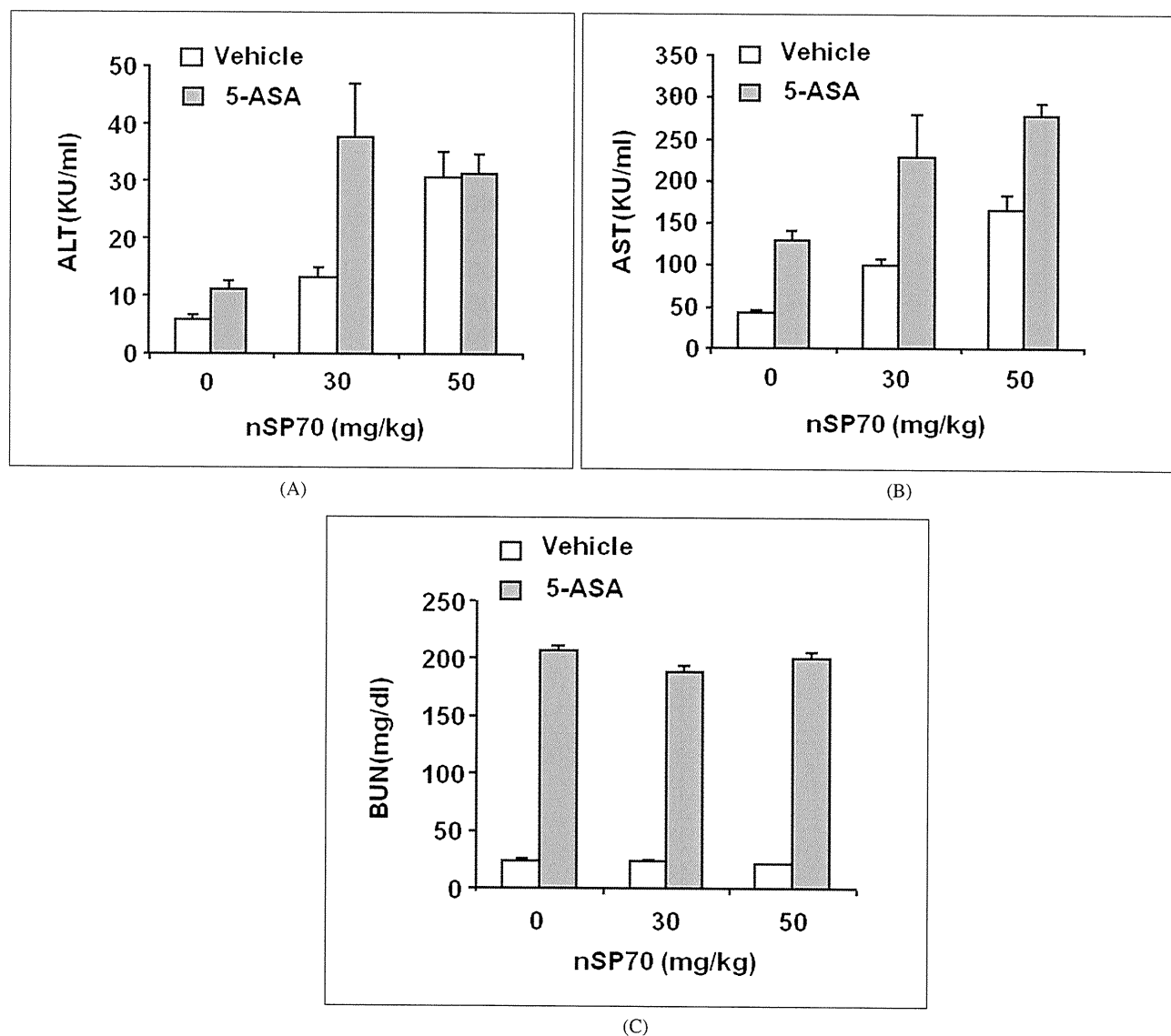


Fig. 1: Effect of nSP70 on 5-aminosalicylic acid (5-ASA)-induced toxicity. Mice were injected intraperitoneally with 5-ASA at 0 (open column) or 500 mg/kg (gray column) and intravenously with nSP70 at the indicated doses. After 24 h, the serum was collected. Shown are the levels of ALT (A), AST (B), and BUN (C). Data are means \pm SEM ($n = 4$)

tions between nSP70 and chemicals in their administration and absorption, nSP70 and chemicals were administered intravenously and intraperitoneally, respectively. Administration of nSP70 alone has been shown to cause liver injury but not kidney injury (Nishimori et al. 2009b). Also, in this study, nSP70 did not enhance kidney injury induced by 5-aminosalicylic acid or tetracycline, two drugs known to be nephrotoxic (Grisham et al. 1992; Kunin 1971). The renal toxicity of cisplatin, another nephrotoxic chemical, was unaffected by nSP70 (Nishimori et al. 2009a). Like 5-aminosalicylic acid, tetracycline, and acetaminophen (Chun et al. 2009; Herzog and Leuschner 1995; Kunin 1971), nSP70 is hepatotoxic (Nishimori et al. 2009b), and we showed here that its co-administration synergistically enhanced liver injury. These findings indicate that nSP70 may enhance the toxicity of certain chemicals. Therefore, it will be important to assess the tissue-specific risk of nano-sized materials.

The nSP70 particles had a lethal effect when combined with tetracycline. The 50% lethal dose of tetracycline is 318 mg/kg by intraperitoneal injection in mice. A previous report showed that 100 mg/kg nSP70 is lethal in 100% of mice (Nishimori et al.

2009b). A single injection of tetracycline (100 mg/kg) or nSP70 (30 or 50 mg/kg) alone was not lethal in this study but a combination of the two was. Co-administration of cisplatin and nSP70 showed a similar synergistic lethal effect. This could be due to an interaction between nSP70 and serum albumin. Tetracycline in the bloodstream can bind to albumin (Popov et al. 1972; Powis 1974). Likewise, serum albumin adsorbs onto nano-sized silica particles (Dutta et al. 2007). When injected intravenously, 100-nm anionized albumin-modified liposomes are taken up by hepatic endothelial cells and Kupffer cells (Kamps et al. 1997), which normally clear chemically modified albumin (Jansen et al. 1991). Thus, tetracycline-bound serum albumin may adsorb onto nSP70, causing it to be taken up by the hepatic endothelial cells and Kupffer cells in the liver where it may accumulate and cause lethal liver damage.

Indirect interactions between chemicals and nano-sized particles mediated by serum albumin may be useful for estimating the toxicity of nano-sized materials. In this study, co-treatment of mice with nSP70 (50 mg/kg) and tetracycline decreased BUN levels compared to tetracycline alone or nSP70 (30 mg/kg) and tetracycline. A similar decrease in BUN levels